

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Julia Gretšanaja
MIKRORNADE KASUTUSVÕIMALUSED TERAPEUTILISTEL
EESMÄRKIDEL
Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendaja: PhD Tarmo Annilo

Tartu 2013

Sisukord

Kasutatud lühendid	3
Sissejuhatus	5
1. MikroRNAd biogenees	6
2. MikroRNAd toimetehhanism ja bioloogiline roll	8
3. MikroRNAd ja haigused	8
4. Sünteetiliste miRNA analoogide puhul kasutatavad modifikatsioonid	9
4.1 Anti - miRNA oligonukleotiidid	9
4.1.1 AMO puudused	11
4.2 Miimikud	12
4.2.2 Miimikute puudused	12
4.3 Viirusvektorid	13
4.4 Liposoomid, nanopartiklid, mikrosfäärid	13
5. MikroRNAd kasutamine terapeutilistel eesmärkidel	15
5.1 AntagomiR miR-10b	16
5.2 MikroRNA-34 miimikud	19
5.3 MikroRNA-122	21
Kokkuvõte	24
Summary	25
Kasutatud kirjandus	26
Kasutatud veebiaadressid	33

Kasutatud lühendid

2'OMe RNA – 2'-O'-metüül RNA

2' - MOE – 2'-O-Metoksü-etüül

AAV – adenoviirusel põhinev vektor

ABC – *adenosine triphosphate-binding cassette*

AGO – Argonaut (*Argonaute*)

AMO – Anti-miRNA oligonukleotiid

Bcl-2 B-rakuline lümfoom 2 (*B-cell lymphoma 2*)

Bp – Aluspaar (*base pair*)

BRMS1 – rinnavähi metastaseerumise supressor-1 (*breast cancer metastasis suppressor-1*)

CDK4/6 – tsükliin-sõltuv kinaasi kompleks 4/6

DGCR8 – (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*)

E2F3 – E2F – transkriptsiooni faktor 3

FS – Fosforotioaat

HCV – C-hepatiidi viirus

HDL – kõrge tihedusega lipoproteiin (*high-density lipoprotein*)

IRES – sisemine ribosoomi sisenemiskoht (*internal ribosome entry site*)

KLF4 - tuumor-supressor (*Krüppel like factor 4*)

KLL – kroonilise lümfoidse leukeemia

LDL – madala tihedusega lipoproteiin (*low-density lipoprotein*)

LMP1 – latentne membraanne proteiin-1

LNA – lukustatud nukleiinhape (*Locked nucleic acid*)

miRISC – miRNA - indutseeritud vaigistav kompleks (*miRNA - induced silencing complex*)

miRNA – mikroRNA

MRE – mikroRNAd ära tundev element (*miRNA Recognition Element*)

MT1-MMP – membraan tüüp I metalloproteaasi (*membrane type 1 metalloprotease*)

NF1 – neurofibromiin

Ppara – *peroxisome proliferator-activated receptor-α*

pre-miRNA – prekursor mikroRNA

pri-miRNA – primaarne transkript, mis tehakse miRNA geenide pealt

PTEN – *Phosphatase and tensin homolog*

RISC – *RNA-induced silencing complex*

RHOC –pro-metastaatiline faktor (*Ras homolog gene family, member C*)

SIRT1 – *silent information regulator*

SHIP1 – *Src homology-2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1*

TAR – transaktivatsioonitundlik (*transactivation responsive*)

TGF- β - transformeeriv kasvufaktor β

TRAP – *Thyroid hormone-associated protein*

TRBP – transaktivatsioonitundlik RNA - seonduv valk

uPAR – urokinaasse plasminogeeni retseptor (*urokinase plasminogen activator receptor*)

UTR – mittekodeeriv regioon (*untranslated region*)

Sissejuhatus

Genoomika ja proteoomika tehnoloogiate kiire areng võimaldab neid üha enam kasutada haiguste diagnoosimiseks võimalikult varastel arengustaadiumitel. See omakorda aitab alustada õigeaegset ja täpset ravi.

Paljud uuringud on näidanud, et mittekodeerivad RNAd on olulised geenide avaldumise ja rakuliste protsesside regulaatorid. Mittekodeerivate RNAd hulka kuuluvad ka mikroRNAd (miRNAd), üheaheelalised 18 - 22 nukleotiidi pikkused regulaatormolekulid, mis seonduvad mRNA komplementaarse järjestusega. Selle protsessi tulemuseks on mRNA stabiilsuse vähenemine või valgu translatsiooni blokeerimine. MiRNAd võivad reguleerida enam kui 30% valku kodeerivate geenidest, samuti võib üks miRNA reguleerida mitmeid geene. Praeguseks on iseloomustatud umbes 1900 inimese miRNAd (www.mirbase.org). Endogeensed miRNAd osalevad mitmetes raku elutegevuse seisukohalt olulistest bioloogilistes protsessides, nagu näiteks rakutsükkel, rakkude jagunemine, apoptoos, rakkude diferentseerimine, rasvade metabolism, hematopoees ja stressitaluvus. Samuti osalevad nad mitmetes patoloogilistes protsessides nagu näiteks kasvaja teke ja levik, reguleerides onkogeensete või tuumor-supressor geenide ekspressiooni ja aktiivsust. MiRNAd keskne roll paljude bioloogiliste protsesside regulatsioonis on äratanud huvi miRNAd põhjal arendatud tehnoloogiate kasutamiseks erinevate haiguste ravis. MiRNAd kasutamine terapeutilistel eesmärkidel hõlmab kahte peamist strateegiat. Esimese strateegia puhul toimub onkogeensete miRNAd (onkomirid) pärssimine miRNA antagonistide (anti - miRNA) abil. Onkomirid põhjustavad rakkude proliferatsiooni, kui nad on üleekspresseeritud. Anti - miRNAd on komplementaarsed endogeense miRNAGA ning sisaldavad mitmeid keemilisi modifikatsioone. Toimub onkomir - anti - miRNA kompleksi moodustumine ning lõpuks onkomiri ekspressiooni pärssimine. Teine strateegia hõlmab endas tuumor - supressor miRNA taseme taastamist miRNA miimikute abil. Tuumor - supressor miRNA ekspressiooni maha surumine põhjustab vähki ja selle vältimiseks kasutatakse sünteetilisi oligonukleotiide, mis omavad sarnast toimet endogeensete miRNAdega. Nii nagu anti - miRNAd vajavad ka miimikud mitmeid keemilisi modifikatsioone nende stabiilsuse tõstmiseks ja nõutud kohta jõudmiseks.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on analüüsida miRNAdel põhinevate terapeutiliste lahenduste erinevaid aspekte ning tuua välja nii perspektiivsemad edasised töösuunad kui ka olulised lahendamist vajavad kitsaskohad.

1. MikroRNAde biogenees

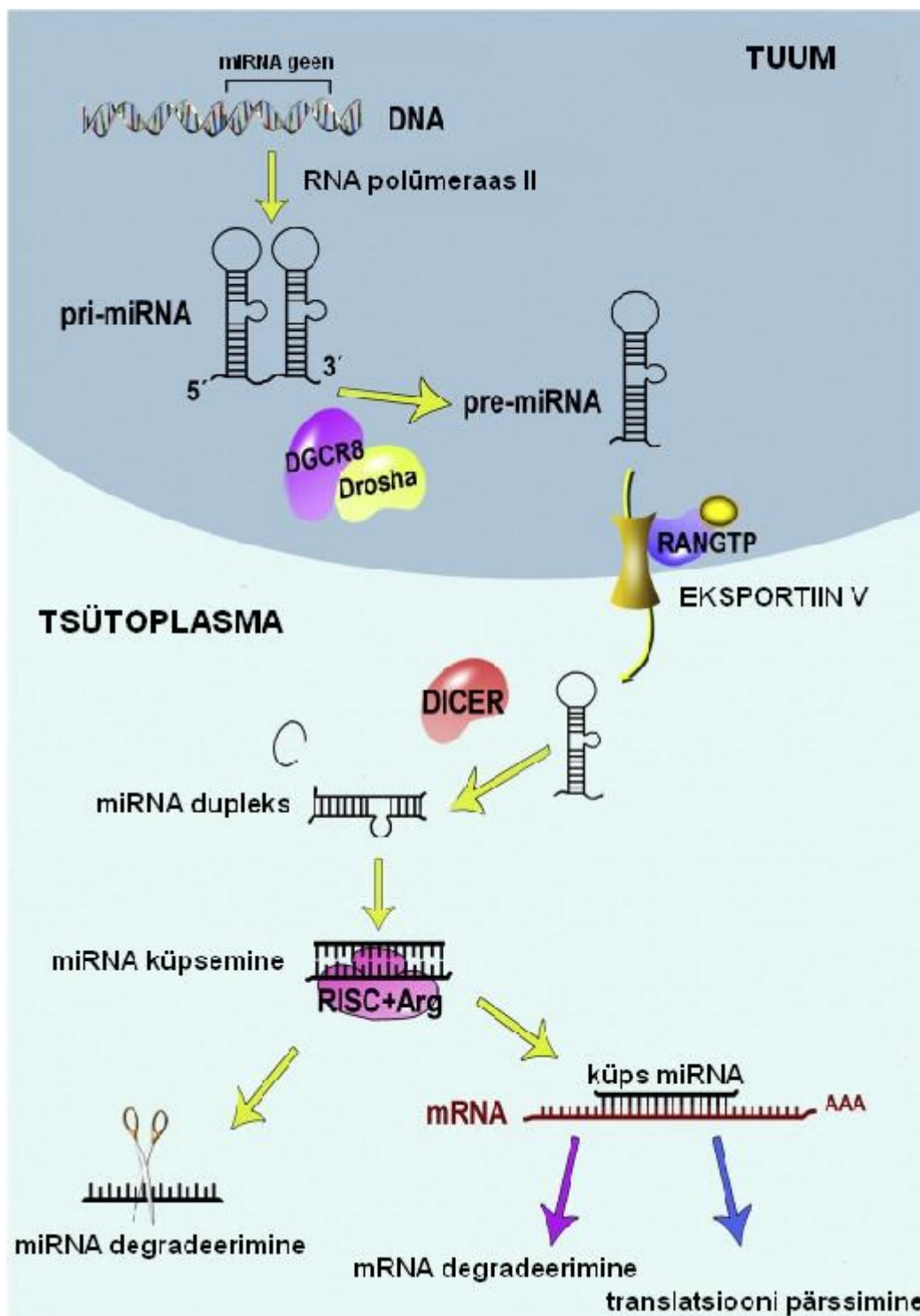
MiRNAd transkribeeritakse peamiselt RNA polümeraas II poolt 1...3 kb pikkuste primaarsete transkriptidena, mida nimetatakse pri-miRNAdeks. Genoomis võivad miRNA geenid paikneda nii üksikult kui ka klastritena. Paljud miRNA geenid asuvad valke kodeerivate geenide intronites. Sarnaselt mRNAdega on ka pri-miRNAde 5' cap struktuur ja polü(A) saba (Lee Y, 2004).

Kanoonilisel kujul toimub miRNAde biogenees nii, et valgukompleks, mille kaks peamist komponenti on RNAas III ensüüm Drosha ja DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*), tunneb ära pri-miRNAs sisalduva juuksenõela struktuuri. DGCR8 seondub juuksenõela struktuuri alusele ja määrab sellega Drosha orientatsiooni. Drosha lõikab kaheaahelalist RNAd ja selle protsessi tulemusena moodustub 70 – 100 nukleotiidi pikkune juuksenõela struktuuriga molekul ehk pre – miRNA, mis sisaldab 3' otsas kahe nukleotiidi pikkust etteulatuvat osa (Lee Y, 2003).

Järgnevalt transporditakse pre-miRNA eksportiin-5 abil tuumast välja tsütoplasmasse, kus toimub pre-miRNA töötlemine RNAas III - tüüpi ensüümi Dicer poolt, mis toimib koos TAR RNA seonduva proteiiniga (TRBP). Diceril on kõrge afiinsus RNA 3'-otsas paikneva kahe nukleotiidi pikkuse etteulatuva osa suhtes. Diceri ja TRBP valkude dsRNAGA seonduvad domäänid tunnevad ära juuksenõelastruktuuri ja Diceri poolt lõigatakse välja 19-23 aluspaari pikkune RNA dupleks. Pärast ahelate eraldamist helikaasi abil ühineb miRNA juhtiv ahel RISC (*RNA-induced silencing complex*) kompleksiga ning sekundaarne ahel (*passenger strand*) tavaliselt lagundatakse. Siiski on põhimõtteliselt mõlemad ahelad võimelised lülituma miRISC kompleksi koosseisu. Otsustav faktoriks on miRNA duplexi termodünaamika: ahel, mille 5'-ots on vähem stabiilne, lülitatakse RISC kompleksi ning vähem stabiilse 5'-otsaga ahel lagundatakse (Khvorova jt, 2003; Schwarz jt, 2003).

Imetajatel koosneb RISC kompleks peamiselt AGO (*Argonaute*) perekonda kuuluvatest valkudest, sisaldades ka teisi valke, mis on vajalikud transkriptsiooni modulatsiooniks ja repressiooni indutseerimiseks.

Pärast miRISC kompleksi moodustamist seondub see sihtmärk-mRNA 3-UTRiga (*untranslated region* ehk mittetransleeritav ala). RISC kompleks, mis sisaldab miRNAd ja sihtmärk-mRNAd, pärsib mRNA translatsiooni kas valgusünteesi vaigistamise või mRNA degradatsiooni kaudu. Hinnatakse, et miRNAd võivad reguleerida kuni 30% inimese valku kodeerivatest geenidest (Sassen S. Jt, 2008).



Joonis 1. MiRNAde biogenees. MiRNA-d transkribeeritakse RNA polümeraas II poolt pri - miRNA-ks. DGCR8 ja Drosha abil moodustab pri - miRNAdest pre - miRNA, mis transporditakse eksportiin-V abil tsütoplasmasse ja hiljem töödeldakse Dicer ja TRBP poolt. Tulemuseks on umbes 22 aluspaari pikkune kaheaheelaline RNA molekul. Viimane etapp on ahelate eraldamine ning üheaheelalise RNA seundumine miRISC kompleksiga (Esteban Orenes-Piñero 2012).

2. MikroRNAde toimemehhanism ja bioloogiline roll

MiRNA seondub märklaud-RNA-ga komplementaarse paardumise teel. MiRNAga seonduv järjestus märklaud-RNA-s on tuntud kui miRNAd ära tundev element, (MRE, *miRNA Recognition Element*). Enamasti asub MRE järjestus mRNA 3' mittetransleeritavas piirkonnas (3'-UTR) (Chen K., jt, 2009), kuid on ka töid, mis on tuvastanud funktsionaalsete MREde paiknemist 5' mittetransleeritavas piirkonnas (5'-UTR) (Ajay SS jt, 2010) või kodeerivas järjestuses (Tay jt, 2008). Imetajatel ei ole miRNA peaaegu mitte kunagi komplementaarne MRE järjestusega kogu ulatuses. MiRNA toime märklaud-RNAle sõltub miRNA 5' otsa kaheksa esimese (nn. "seemnejärjestus", *seed sequence*) nukleotiidi seondumisest (Doench ja Sharp, 2004). On ka näidatud, et sihtmärgi äratundmine 5' otsa järjestuse kaudu ei toimu alati ainult 2-8 nukleotiidi abil (Miranda jt, 2006), samuti on olemas nn. *non seed* tuvastamise mehhanismid (Tay jt, 2008). Näiteks ei ole täielikku komplementaarsust kahe lin-41 MRE ja sinna seonduva let-7 5' otsa vahel (Friedman RC jt, 2009).

Katsed *in vitro* ja *in vivo* erinevate mudelite peal on näidanud, et mRNA ekspressiooni võidakse pärssida mitmete mehhanismide kaudu. Näiteks let-7 ja lin-4 võivad märklaud-mRNA translatsiooni suruda alla ilma mRNA lagundamiseta. Translatsiooni allasurumisel mängivad olulist rolli mRNA 5' *cap* struktuur ja 3' polü(A) saba (Filipowicz W jt, 2008).

Märklaud-RNA lagundamine algab peamiselt deadenülatsiooniga (Eulalio A, 2009). Wakiyama ja tema tööriühm näitasid, et deadenülatsioon, mRNA lagundamine ja translatsiooni pärssimine võivad toimuda teineteisest sõltumatult (Wakiyama M., 2010). Samuti osaleb miRNA *cap* struktuuri eemaldamisel (Wakiyama M., 2010).

Imetaja miRNAde põhiliseks toimemehhanismiks on ilmselt märklaud-mRNA taseme vähenemine (Guo H, 2010). Translatsiooni pärssimine on edukas siis, kui 3'-UTR sisaldab mitut MRE järjestust ja need asuvad optimaalsel kaugusel üksteisest (Grimson A, 2007). On näidatud, et miRNA võib seonduda ka promooter-piirkonnaga (Chekulaeva M, 2009) ja potentsiaalselt saab osaleda geeni ekspressiooni aktivatsioonis.

Tänapäevaks on teada umbes 1900 inimese miRNAd (mirbase.org, august 2012).

3. MikroRNA ja haigused

Mitmete haiguste korral on näidatud miRNAde ekspressioonitaseme muutusi. Praeguseks on teada rohkem kui 5000 erinevat seost miRNAde ja haiguste vahel (Human microRNA disease database 202.38.126.151/hmdd/mirna/md/, jaanuar 2012).

Üks esimesi uuringuid miRNAde bioloogilise tähtsuse kohta viidi läbi vähitekke uurimisel Calini ja tema kolleegide poolt. Nad uurisid kroonilise lümfoidse leukeemia (KLL) arenguga seotud deletsiooni kromosoomis 13q14, et leida tuumor-supressor geeni (Calin, G.A. jt, 2002). Calini töörühm leidis, et kuigi selles piirkonnas ei leidu tuumor-supressor funktsiooniga kodeerivat geeni, paikneb seal kaks miRNA geeni, miR-15a ja miR-16-1, mis ekspresseeruvad ühe polütsistronse RNAna. Kuna deletsioon kromosoomis 13q14 põhjustas kahe miRNA kadumist, kinnitasid need tulemused teooriat, et miRNAd võivad osaleda vähi patogeneesis (Calin, G.A. jt, 2002). Järgnevad miRNAde ekspressiooni profiilide uuringud näitasid muutusi miRNAde tasemes rinna- (Schooneveld jt, 2012), kopsu- (Wang jt, 2012), pankrease- (Srivastava jt, 2011), eesnäärme- (Hassan jt, 2012), pärasoole- (Piepoli jt, 2012) ja teiste vähkide puhul.

Samuti on leitud, et miRNAd osalevad paljude teiste haiguste, nagu näiteks Alzheimeri tõbi (Barbato C, 2009), Parkinsoni tõbi, Huntingtoni tõbi (Savas, J.N. jt, 2008), viirusinfektsioonid, diabeet (Roggli jt, 2011; Fu jt, 2010), müopaatia (Tang jt, 2009) jt tekkes.

MiRNAde ekspressiooni taset reguleeritakse erinevate faktorite ja mehhanismide abil. Ekspressiooni taseme muutus võib mõjutada kõiki bioloogilisi protsesse, sealhulgas rakkude proliferatsiooni (miR-125b ja let-7), DNA reparatsiooni ja metülatiooni, apoptoosi ning kutsuda esile proinflammatoorset ja põletikuvastast reaktsiooni. MiRNAdel on ka oluline roll nii kaasasündinud kui ka adaptiivse immuunsüsteemi töös (Lu jt, 2009). Normaalne miRNAde ekspressioon on vajalik immuunsüsteemi rakkude diferentseerumiseks.

4. Sünteetiliste miRNA analoogide puhul kasutatavad modifikatsioonid

4.1 Anti - miRNA oligonukleotiidid

Anti-miRNA oligonukleotiidid (AMO) on lühikesed modifitseeritud üheaahelised RNA molekulid, mis seonduvad spetsiifiliselt miRNAdega. Selle protsessi tulemuseks on miRNAde inhibeerimine ja nende sihtmärkide derepressioon.

Esimene edukalt kasutatud AMO oli 2'-O'-metüül RNA, mis oli täielikult komplementaarne märklaud - miRNaga (Meister G. jt, 2004; Hutvagner G. jt, 2004). 2'OMe RNA omab kõrget afiinsust miRNA suhtes ning on resistentne paljude nukleasid suhtes. Endo- ja eksonukleasid

degradeerivad nukleiinhappeid fosfaatsideme lõikamise kaudu nukleotiidide vahel. Fosforotioaat (FS) modifikatsiooni puhul asendab hapniku väävli aatom, mis takistab nukleaasidel selle sideme lõhkumist. FSi saab lisada kogu ahela ulatuses või ainult kriitilistes kohtades. FS modifikatsiooni nõrgaks küljeks on vähenenud afiinsus miRNA suhtes (Lenox K. jt, 2006).

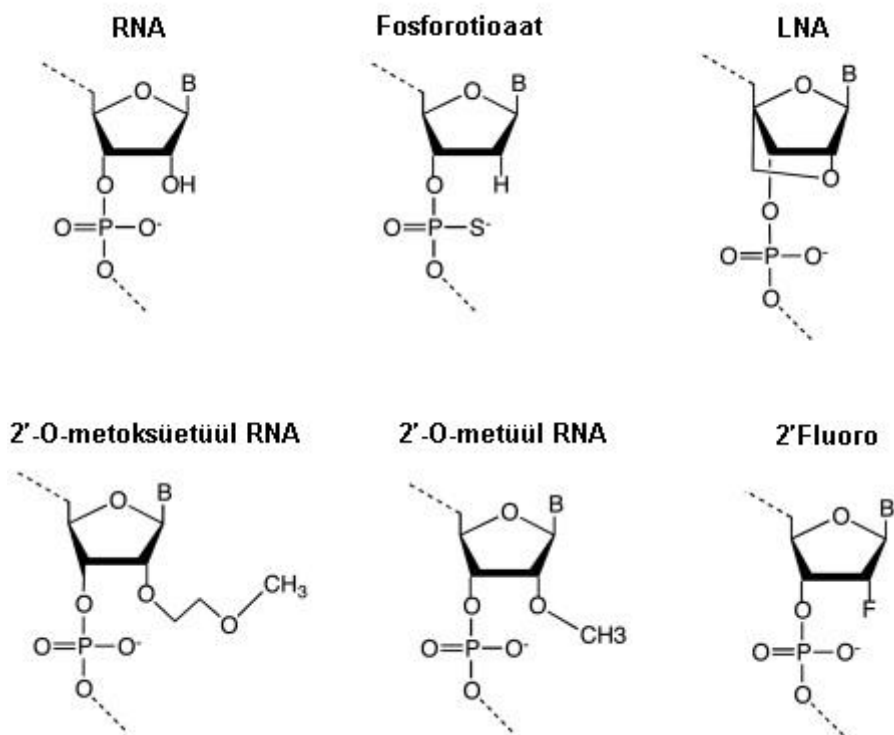
Krützfeldt ja tema kolleegid kasutasid 2'-OMe oligonukleotiide koos FS sidemega, kuid lisasid kolesterooli rühma 3' – otsa, mis parandas molekuli kohaletoimetamist *in vivo* (Krützfeldt J, 2007). Kolesterool seondub kõrge ja madala tihedusega lipoproteiinidega (HDL ja LDL, high-density lipoprotein ja low-density lipoprotein), mis omakorda seonduvad raku pinnal asuvate retseptoritega, mille tagajärjel sisenevad modifitseeritud oligonukleotiidid rakku. Selliselt modifitseeritud AMOd nimetatakse antagomiriks.

2'-O-Me RNA on looduslik suhkru modifikatsioon, mis esineb paljudes organismides. Kunstlikud 2' modifikatsioonid töötati välja selleks, et tõsta afiinsust miRNA suhtes ning tõsta sünteetiliste oligonukleotiidide resistentsust nukleaaside suhtes. Mõned nendest modifikatsioonidest on paremate omadustega kui 2'-O-Me RNA. Sellisteks on 2'-O-Metoksü-etüül, 2'-Fluoro, 2, 4-Metüleen ja LNA modifikatsioonid.

Tugevamat miRNA pärssimist on võimalik saavutada kasutades LNA-antimiRi (lukustatud nukleiinhappega antimiR). LNA on nukleiinhappe analoog, kus riboosi ring on "lukustatud" metüleen-silla abil, mis ühendab 2'-O aatomit 4'-C-aatomiga (Petersen M. jt, 2004). LNA-antimiRid on kõrge afiinsusega, sellepärast võib LNA AMO olla lühem kui märklaud - miRNA.

Modifitseeritud oligonukleotiidide võrdlus näitas, et LNA/2'-O-Me, mille otstes on FS, on kümme korda efektiivsem kui ainult 2'-O-Me või fosforotioaadi kasutamine (Lennox K.A. jt, 2010).

Keemilistest modifikatsioonidest sõltub sünteetilise miRNA stabiilsus ja toime. Kõrge afiinsusega oligonukleotiidid, sh LNA/2'-O-Me ja 2'-F/MOE modifitseeritud AMOd, moodustavad dupleksi märklaud - miRNaga (Davis S. jt, 2009; Rayner K. jt, 2011). Madala afiinsusega oligonukleotiidid, sh 2'-O-Me ja 2' - MOE, soodustavad miRNA degradatsiooni (Davis S. jt, 2009; Rayner K. jt, 2011).



Joonis 2. RNA modifikatsioonid. Näidatud on fosforotioaat, LNA, 2'-O-Metoksü-etüül, 2, 4-Metüleen ja 2'-Fluoro modifikatsioonid (Lennox K.A. ja Behlke M.A., 2010).

4.1.1 AMO puudused

AMO kasutamine terapeutilise molekulina toob endaga kaasa riski mõjutada lisaks sihtmärgiks olevale miRNAle ka teisi RNAsid. Seetõttu on väga oluline teada koostoimeid AMO ja endogeensete nukleiinhapete vahel. Samuti võib olla antogomir-ravi tulemuseks oluliselt muutunud endogeensete miRNAde efektiivsus, kuna antimiR seob märklaud-miRNA miRISC kompleksi ja see muutub ligipääsmatuks teistele endogeensete miRNAdele (Khan A. jt, 2009).

AMO kasutamisel põhineva terapeutilise meetodi rakendamiseks on vaja täpselt teada preparaadi doosi, et antagomiRi tase ei ületaks nõutavat farmakoloogilist aktiivsust.

Samuti on teada, et mõned miRNAd võivad osaleda nii vähitekke initsiaatorite kui ka supressoritena (Huse J.T. jt, 2010). See muudab antisense tehnoloogial põhinevate preparaatide väljatöötamise keerukaks.

Vaatamata sellele, et on välja töötatud keemilised modifikatsioonid, mis võimaldavad vältida degradatsiooni ning tõsta antisense nukleotiidide stabiilsust ja kohaletoimetamise efektiivsust, on veel mõningaid lahendamist vajavaid aspekte. Näiteks efektiivse ja spetsiifilise kohaletoimetamise

viisi väljatöötamine vähem kättesaadavatesse organitesse. Samuti on vaja hinnata võimalikke kõrvalmõjusid.

4.2 Miimikud

MiRNA miimikud on kaheahelalised RNAd, mis koosnevad juhtivast ja sekundaarsest ahelast. Juhtiv ahel on identne küpse miRNA järjestusega ning imiteerib endogeense miRNA funktsioone. Teine ahel on osaliselt või täielikult komplementaarne juhtiva ahelaga.

Miimikud vajavad keemilisi muudatusi, et tõsta nende resistentsust nukleaaside vastu, pärssida kaasasündinud immunsüsteemi aktiveerimist, vähendada kõrvaltoimete riske ja suurendada rakkude tundlikkust. Kasutatakse 2'-O-Me (Chiu Y. jt, 2003), 2'-MEO (Prakash t. jt, 2007), 2'-F (Layzer J. jt, 2004) ja kolesterooli modifikatsioone. Aromaatsete ühendite lisamine 3' otsa põhjustab miimikute aktiivsuse tõusu ja degradatsiooni vähenemist (Kitade Y. jt, 2010).

Optimaalne miRNA miimik sisaldab keemilisi muudatusi, mis tagavad korrektse laadimist RISC kompleksi, *passenger* ahela degradatsiooni ja miimiku aktivatsiooni. Modifitseeritud sekundaarne ahel sisaldab 2'-O-Me RNAd, mis kaitseb miRNAd degradatsiooni eest ning pärsib immuunvastust (Hamm S, 2010; Eberle F, 2008; Sioud M, 2007). Juhtiv ahel sisaldab 2'-O-Me muudatusi 3' otsas ja kahenukleotiidset üleulatuvat osa, mis tagavad õige laadimist RISC kompleksi ja sekundaarse ahela degradatsiooni. Valgu kompleksi laadimisel toimub ahelate lahtikerimine ja sekundaarne ahel lagundatakse nukleaaside poolt.

Optimaalse bioloogilise aktiivsuse saavutamiseks peavad miRNA miimikud olema dupleksis, mitte üheaahelalise molekulina (Garzon R, 2010). Üheaahelalise miR-199a-3p viimine maksavähi rakkudesse ei oma bioloogilist toimet, samas kui miR-199a-3p miimikute heterodupleksis kasutamisel vähenes rakkude proliferatsioon.

4.2.2 Miimikute puudused

Kuna üks miRNA võib reguleerida mitut geeni, võib miRNAd ekspressiooni kunstlik muutmine põhjustada kõrvaltoimeid ja omada toksilist toimet. Üheks näiteks on miR-29 ekspressiooni taseme reguleerimine. *In vitro* ja *in vivo* katsed näitasid miR-29 miimikute vähivastast potentsiaali (Xiong, 2010; Mott, 2007). Samas osaleb miR-29 ka onkogeensete radade reguleerimises. Seega võib süstemaatiline miR-29 miimikute üleekspressioon põhjustada vähi teket või teisi kõrvaltoimeid.

Selliseid probleeme saab lahendada efektiivsete kohaletoimetamise mehhanismide väljatöötamise kaudu.

4.3 Viirusvektorid

Üheks enimkasutatavaimaks meetodiks geneetilise materjali rakkudesse viimisel on viirusvektorid. Ka see pole ideaalne meetod, sest sellised vektorid võivad põhjustada immuunvastust, geneetilise materjali inserteerumist genoomi, ning nende ekspressioon on lühiajaline.

Üks võimalikest vektoritest on lentiviirus-vektor. Lentiviirus kuulub retroviiruse klassi ja tema paljutöötav terapeutiline omadus seisneb selles, et lentiviirus on võimeline nakatama jagunevaid ja mittejagunevaid rakke ning püsib stabiilselt genoomi integratsiooni kaudu (Chang, 2007).

Geeni ekspressiooni analüüsid ja qPCR on näidanud madalat miR-128-1 ekspressiooni taset vähirakkudes võrreldes terve kudedega. Uuringud näitasid, et pri-miR-128-1 ekspressiooni glioomi rakkudes on võimalik tõsta, kasutades kohaletoimetamiseks lentiviirus-vektoreid (Godlewski, 2008). Selleks amplifitseeritakse genoomsest DNAST 82 bp pikkune fragment, mis sisaldab miR-128-1, ja 200 bp vastassuunalist ja pärisuunalist järjestust. Seejärel kloneeritakse fragment lentiviirus-vektoris, ekspresseeritakse pri-miRNAd ja pakitakse lentiviirus partiklitesse. miR-128-1 taastamine lentiviirusplasmidi abil põhjustab glioomi rakkude proliferatsiooni vähenemist. Samuti kasutatakse adenoviirusel põhinevaid vektoreid. Need vektorid ei integreeru genoomi ega oma toksilist toimet, nagu on näidanud I ja II faasi kliinilised katsed. Teine eelis on see, et toimub efektiivne sisenemine sihtmärk-rakku. Kota ja kolleegid näitasid, et miR-26 ekspressioon on oluliselt vähenenud maksavähi korral (Kota, 2010). Autorid liitsid mir-26 APV vektorisse ja katsetasid viiruslikke partikleid hiire maksavähi rakkudes. Veenisiseste süstide tulemusena oli stimuleeritud tuumori rakkude apoptoos ja nende kasv oli pärsitud.

4.4 Liposoomid, nanopartiklid, mikrosfäärid.

Liposoom on kahekihiline fosfolipiid-struktuur. Sellised struktuurid seonduvad oligonukleotiididega ja moodustavad nendega komplekse (Zhao X. jt, 2009). Katioonsed liposoomid kaitsevad oligonukleotiide degradatsiooni eest ning tõstavad oligonukleotiidide eluiga ja omastamist rakkude poolt. Liposoomide kasutamist terapeutilistel eesmärkidel takistab see, et nad on rakkudele toksilised ja põhjustavad allergilisi reaktsioone (Malik R. ja Roy L., 2008). Samuti kogunevad nad

eelistatuna retikuloendoteliaalsüsteemi, mis on osa inimese immuunsüsteemist. See aga piirab liposoomide eluiga ja juurdepääsu kudedesse. Erinevalt liposoomidest on nanopartiklid ja mikrosfäärid vähem toksilised ning neid saab edukamalt kasutada oligonukleotiidide kohaletoimetamiseks.

Selliste struktuuride kohaletoimetamiseks on välja töötatud erinevad mehhanismid. Üheks meetodiks on unikaalse kasvaja-spetsiifilise valgu iRGD kasutamine. Kazuki N. Sugahara ja tema kolleegid näitasid, et partiklid, mis on seotud iRGD valguga, jõuavad edukalt kasvajani, seonduvad sellega ning tungivad raku sisse (Sugahara K. N., jt, 2009).

Samuti kasutatakse rakku tungivaid valke, mis on võimelised mitmeid bioaktiivseidprodukte (kaasa arvatud nukleiinhapped), õigesse kohta toimetama. Sellise mehhanismi kasutamine ei avalda toksilist toimet ning ei kutse esile immuunvastuse reaktsiooni (Arukuusk P., jt, 2013).

Tabel 1. MikroRNA modifikatsioonide võrdlus (Ramiro G., jt, 2010)

Meetod	Piirangud	Eelised	Katse d	Tuleviku suunad
2'-O-Me AMO	<ul style="list-style-type: none"> Kohalettoimetamine Mitmekordne süstimine vajaliku tulemuse saavutamiseks. Pole täielikult modifitseeritud selleks, et vältida degradatsiooni raku poolt. 	<ul style="list-style-type: none"> Ohutu Parem sidumise afiinsus 	<i>In vitro</i> ja <i>in vivo</i>	Täiustada kohalettoimetamise mehhanismi
LNA	<ul style="list-style-type: none"> Mitmekordne süstimine vajaliku tulemuse saavutamiseks Potentsiaalne toksilisus 	<ul style="list-style-type: none"> Ohutu Efektiivne 	<i>In vitro</i> ja <i>in vivo</i>	Toksilisuse uuringud inimestes
Liposoom/oligonukleotiid kompleks	<ul style="list-style-type: none"> Toksilisus Väga tundlikud raku degradatsiooni suhtes 	<ul style="list-style-type: none"> Täiustatud stabiilsus 	<i>In vitro</i> ja <i>in vivo</i>	Arendada paremaid preparaate
Polümeer-nanopartikkel/oligonukleotiid kompleks	<ul style="list-style-type: none"> Potentsiaalne toksilisus 	<ul style="list-style-type: none"> Täiustatud stabiilsus Minimaalsed toksilisuse efektid 	<i>In vitro</i> ja <i>in vivo</i>	Arendada kohalettoimetamise mehhanismi
AAV	<ul style="list-style-type: none"> Toksilisus Kutsus esile immuunvastuse On võimalik insertioon valesse kohta 	<ul style="list-style-type: none"> Pikaajaline ekspressioon 	<i>In vitro</i> ja <i>in vivo</i>	Koguda rohkem andmeid tuumorite kohta
miRNA miimikud	<ul style="list-style-type: none"> Kallis tehnoloogia Raske sisestada neuronidesse Toksilisus 	<ul style="list-style-type: none"> Efektiivne 	<i>In vitro</i> ja <i>in vivo</i>	Täiustada kohalettoimetamise mehhanismi

5. MikroRNAde kasutamine terapeutilistel eesmärkidel

MiRNAde uurimine on andnud tõuke uute ravimite arendamiseks. MiRNAde rakendamine terapeutilistel eesmärkidel hõlmab peamiselt haigus-seoseliste miRNAde ekspressiooni mõjutamist antagonistide või "miimikute" abil.

Viimased saavutused keemiliste modifikatsioonide uurimisel on näidanud miRNAde terapeutilist efektiivsust *in vivo* katsetes. Esimesed miRNAde põhinevad ravimid on jõudnud prekliiniliste ja kliiniliste uuringute faasini. Praeguseks hetkeks on kõige perspektiivsem ravim miravirsen, mis on miR-122 antagomir. Samuti võib lähiajal jõuda kliinilise faasini miRNA-34 miimik ning temast võib saada esimene miRNA miimik, mis hakatakse kasutama kliinilistes katsedes. Peale miRNA-34 miimikut on ka miRNA-208 ja miRNA-10b antagomiridel võimalus jätkata uuringuid edasisel faasil.

Tabel 2. MiRNAde põhinevate ravimite uuringud. (Asuragen Inc, Miragen Therapeutics Inc, Regulus Inc, Rosetta Genomics, Santaris Pharma A/S)

RAVIM	SIHTMÄRK, haigus	STAATUS	VIITE
mikroRNA let-7 miimik	Ras. Kopsuvähk (<i>non-small cell lung carcinoma</i>)	Prekliiniline	Mirna/Asuragen
mikroRNA-21 antagomir	Ppara . Neerude fibroos.	Prekliiniline	Regulus Inc.
mikroRNA-33 antagomir	ABC transporter. Ateroskleroos	Prekliiniline	Regulus Inc., Santaris A/S
mikroRNA-34a miimik	Bcl-2. Kopsuvähk (<i>non-small cell lung carcinoma</i>).	Prekliiniline	Mirna/Asuragen
mikroRNA-92 antagomir	PTEN. Kardiovaskulaarsed haigused	Prekliiniline	MiRagen Inc.
mikroRNA-122 antagomir	Hepatiit C virus	II faas	Santaris A/S
mikroRNA-122 antagomir	Hepatiit C virus	Prekliiniline	Regulus Inc.
mikroRNA-208 antagomir	TRAP. Krooniline südamepuudulikkus	Prekliiniline	MiRagen Inc.
mikroRNA-10b antagomir	E-kadheriin. Rinnavähk	Prekliiniline	Regulus Inc.
mikroRNA-155 antagomir	SHIP1. Immuun- ja põletikulised haigused	Prekliiniline	Regulus Inc.
mikroRNA-191 antagomir	TGF-β. Hepatotsellulaarne kartsinoom	Prekliiniline	Rosetta Genomics

5.1 AntagomiR miR-10b

Mitmed uuringud on näidanud, et miR-10b osaleb metastaaside levikus. Mir-10b ekspressiooni tase on tõusnud pankrease adenokartsinoomi puhul, mis on kiirelt progresseeruv ja metastaase andev vähi tüüp (Bloomston M, 2007). Samuti ekspresseerub mir-10b kõrgel tasemel metastaatilises rinnavähis ning võib põhjustada metastaatilise fenotüübi kujunemist rakkudes, kus see algselt puudus (Ma L. jt, 2007). Mir-10b antagomiri veenisisesed süstid vähki põdevate hiirte kehasse

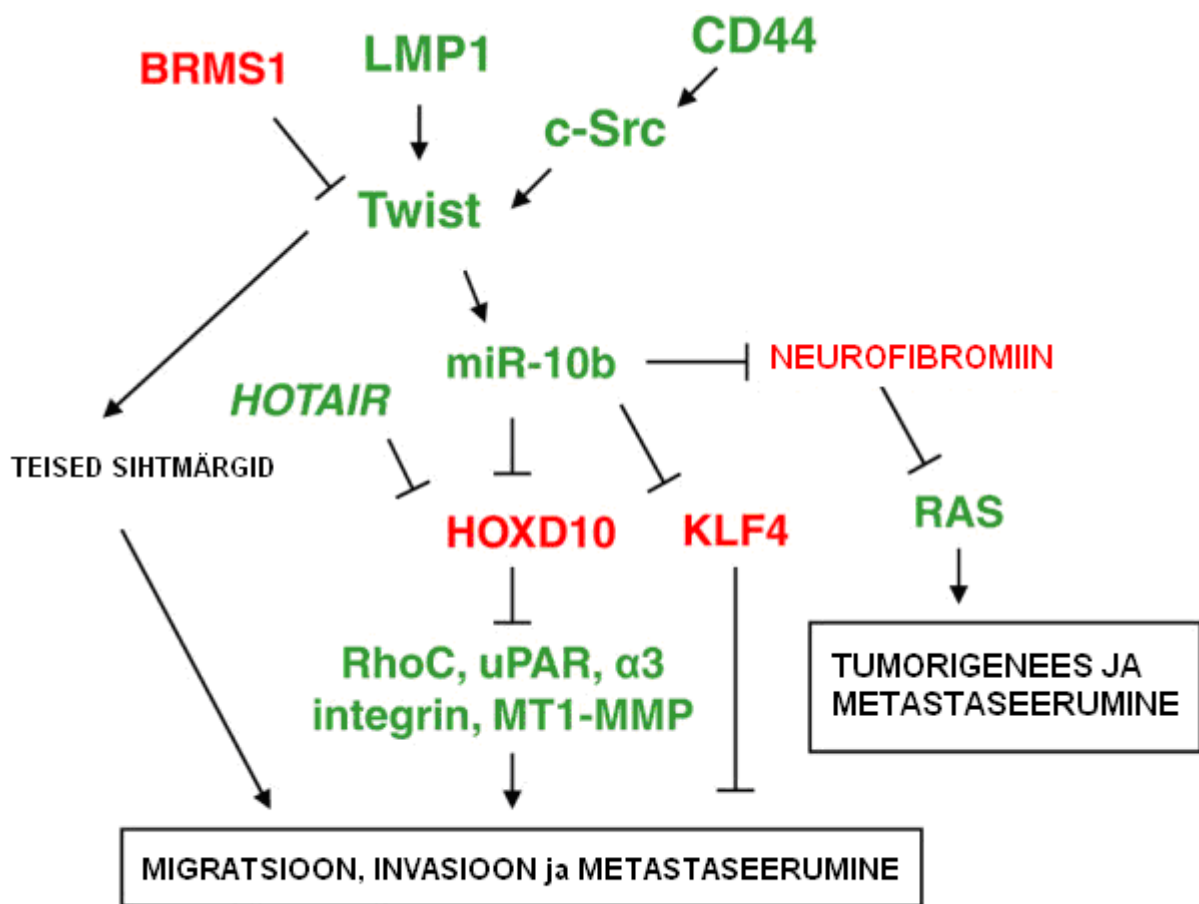
vähendasid oluliselt rinnavähi metastaaside levikut. Visuaalne kontroll kinnitas, et toimus langus metastaaside tekkimises, samas ei mõjutanud see primaarse vähi kasvu (Ma L, 2010). Antud juhul oli antagomir-ravi tulemuseks HOXD10 ekspressiooni taseme vähenemine, mis on otsene mir-10b sihtmärk. Tulemusena toimub RHOC (pro-metastaatiline faktor) ekspressioonitaseme tõus (Ma L, 2007).

Regulus Therapeutics tegeleb ravimi väljatöötamisega, mis põhineb mir-10b antagomiri kasutamisel. Hetkel otsivad nad võimalust jätkata uuringuid kliiniliste katsetega.

Lisaks tuvastati, et mir-10b ekspressiooni tase on vähenenud ilma metastaasita neeruvähis ja on seotud halva prognoosiga selle vähitüübi korral (Heinzelmann J, 2011). Mir-10b pärssimine neurofibromatoosi tüüp I neurofibrosarkoomis vähendas migratsiooni, invasiooni ja rakkude levikut (Chai G, 2010). Mir-10b üheks sihtmärgiks on ka neurofibromiin (NF1) ja tema funktsiooni kadumine on peamine patoloogiline mehhanism neurofibromatoosi tüüp I tekkel. Samuti põhjustab mir-10b induktsioon ninaneelu kartsinoomi rakkudes metastaaside levimist nii *in vitro* kui ka hiire mudelis (Li G, 2010).

Tian Y. jt näitasid, et miRNA-10b suurendab söögitoruvähi rakkude liikuvust ja invasiooni (Tian Y, 2010). See toime on osaliselt maha surutud mir-10b sihtmärgi ning tuumor-supressor KLF4 (*Krüppel like factor 4*, Krüppel sarnane faktor 4) suurenenud ekspressiooni korral.

Seega võib oletada, et mir-10b antagomiril võib olla on potentsiaalne terapeutiline toime.



Joonis 3. Mir-10b poolt vahendatud rajad vähi leviku ja metastaseerumise reguleerimisel.

Mitmed vähitekkega seotud geenid, nagu näiteks rinnavähi metastaseerumise supressor-1 (BRMS1, *breast cancer metastasis suppressor-1*), latentne membraanne proteiin-1 (LMP1), CD44 ja c-Src, reguleerivad Twisti ekspressiooni. Selle kõrgendatud ekspressioon rinnavähis põhjustab mir-10b transkriptsiooni. Mir-10b pärsib HOXD10 valku sünteesi, mis on negatiivne rinnavähi leviku regulaator. Algab selliste pro-metastaatiliste geenide ekspressioon nagu RhoC, urokinaase plasminogeeni retseptor (uPAR, *urokinase plasminogen activator receptor*), α 3-integriin ja membraan tüüp I metalloproteaasi (MT1-MMP, *membrane type 1 metalloprotease*). Toimub vähirakkude migratsioon, invasioon ja metastaseerumine. Samuti on mir-10b sihtmärgiks KLF4, tulemuseks on vähirakkude migratsioon ja kasvaja levik. Neurofibromatoos tüüp 1 vähirakkude korral on mir-10b sihtmärgiks neurofibromiin tuumor supressor. Toimub Ras signaalide aktiveerimine.

Punaselt on märgitud tuumor-supressor või metastaasi-supressor faktorid. Roheliselt – onkogeenid või pro-metastaatilised faktorid (Ma L. Jt, 2010).

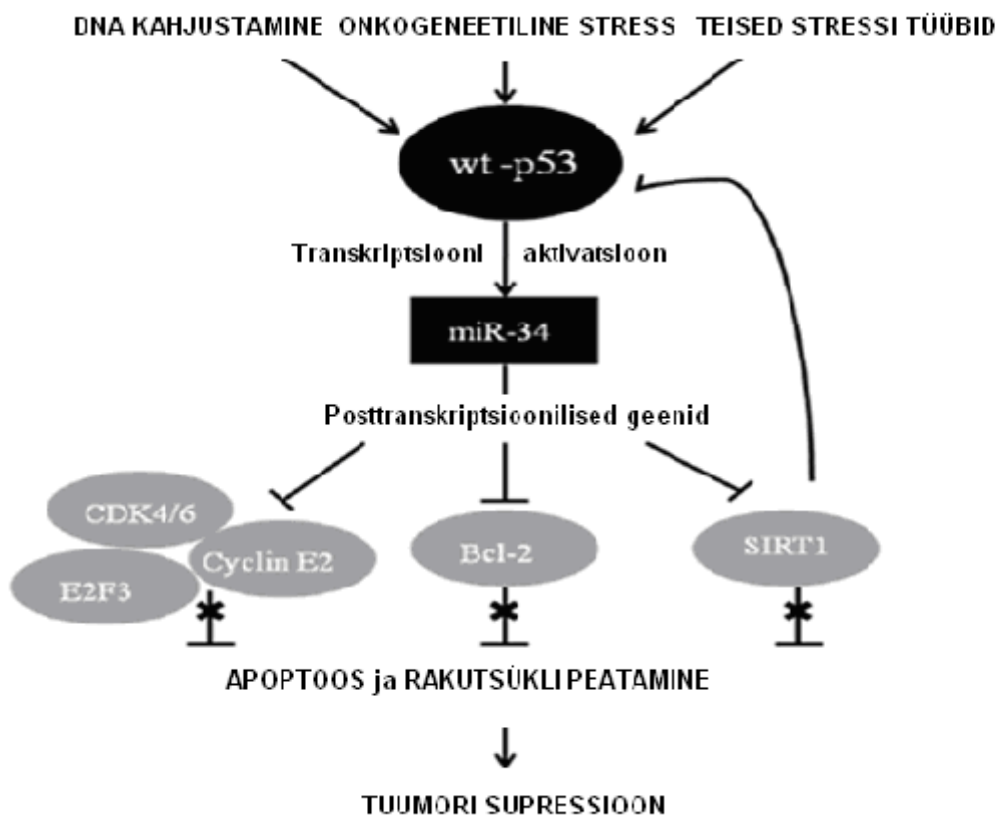
5.2 MikroRNA-34 miimikud

Mir-34 perekond koosneb kolmest liikmest – miR-34a, miR-34b ja miR-34c-st, mis on kodeeritud kahe erineva geeni poolt (Hermeking H, 2010).

Mir-34 ekspressioon on vähenenud paljudes erinevates vähitüüpides, kaasa arvatud mao-(Ji Q. jt, 2008), kõhunäärme-(Ji Q. jt, 2009), eesnäärme- (Kojima K. jt, 2010; Liu C. jt, 2011) ja kopsuvähis (Wiggins J.F. jt, 2010). P53 supressor indutseerib miR-34 ekspressiooni (Tarasov V. jt, 2008; Bommer G.T. jt, 2007).

Mir-34 osaleb apoptoosis ja tema sihtmärgid on SIRT1 (Yamakuchi M. jt, 2008) ning Bcl-2 (Bommer G.T. jt, 2007). HuR, mis on Bcl-2 ja SIRT1 transkriptsiooni faktor, on samuti miR-34 sihtmärk (Kojima K. jt, 2010). Notch1 ja HMGA1 geenid osalevad vähi tekkes ning on ka miR-34a sihtmärgid (Ji Q. jt, 2008).

Mir-34 reguleerib ka CD44 ekspressiooni, mis on erinevate vähirakkude marker ja ka regulaator neoplaasia korral (Liu C. jt, 2011). Mir-34 miimikud vähendasid edukalt eesnäärme-, kõhunäärme-, ja soolevähi rakkude arvu CD44, Notch1/Bcl-2 ja Bcl-2 reguleerimise kaudu.



Joonis 4. p53-miR-34 reguleerimise molekulaarne mehhanism, mis osaleb apoptoosi

reguleerimises. Metsiktüüpi p53 aktiveerib miR-34 DNA kahjustuse ja/või stressi vastusena, mis omakorda pärsib anti-apoptootiliste geenide ekspressiooni. Algab apoptoos ja kasvaja supressioon. Ristikestega on tähistatud anti-apoptootiliste geenide pärssimist miR-34 abiga. Samuti on näidatud SIRT1 geeni regulatsioon kui osa positiivsest reaktsioonist, mis viib p53 aktivatsioonile. Kasutatud lühendid: CDK4/6 – tsükliin-sõltuv kinaasi kompleks 4/6, E2F3 – E2F transkriptsiooni faktor 3, Bcl-2 – B-rakuline lümfoom 2, SIRT1 – *silent information regulator* (Zenz, 2009).

Kui hiirtele, kellele oli siirdatud inimese eesnäärme kasvaja rakke, süstiti veenisiseselt miR-34a miimikud, vähenes kasvaja teke ja levik (Liu, 2011). Mir-34 miimikud soodustasid apoptoosi ja kõhunäärmevähi rakuliinide vastuvõtlikkust gemitsitabiinile ja kiirgusele. Kõhunäärmerakud miR-34a miimikutega siirdati hiirtesse ja tuvastati kasvaja arengu aeglustumist (Ji, 2008). Lisaks sellele süstiti veenisiseselt miR-34 miimikud maovähirakkudesse. Tulemusena on näidatud rakkude kasvu peatumine, suurenes apoptoos ja vähenes kasvaja tekke võimalus (Ji Q, 2008). Samuti tuvastasid Kojima jt, et miR-34a miimikud parandavad resistentsete vähirakkude vastuvõtlikkust paklitakseelile (Kojima K, 2010).

Eesmärgiga uurida miR-34a terapeutilisi võimalusi kopsuvähi ravimiseks on läbi viidud kaks suurt uuringut. Veenisisesed süstid miR-34a-ga, mis oli pakitud lipiidsetes konteinerites, vähendasid siirdetud kasvaja teket hiirtel (Wiggins, 2010). MiR-34a, mis on pakitud uuematesse neutraallipiidsetesse partiklitesse, vähendab kasvaja suurust 60% võrra (Trang, 2011).

Firma Mirna Therapeutics on alustanud miR-34a põhineva ravi pre-kliinilise programmi väljatöötamist ning plaanis alustada esimese etapi I faasi kliinilisi katsetusi 2013. aasta alguses.

5.3 MikroRNA-122

miR-122 on väga piiratud ekspressioonimustriga, selle ekspressiooni tase on kõrge maksas ja praktiliselt puudub teistes kudedes. Umbes 70% kogu maksa miRNAdest moodustab miR-122. miR-122 omab olulist rolli C-hepatiidi viiruse (HCV) replikatsiooni tsüklis. HCV on üheaheelalist RNA-d sisaldav viirus ning tema genoomi suurus on 9,6 kb (Chisari, 2005). HCV põhjustab püsiva infektsiooni maksas, mis võib lõpuks viia tsirroosi või kartsinoomi tekkeni. miR-122 on vajalik HCV replikatsiooniks nakatunud rakkudes. Molekul osaleb regulatsioonis otsese kontakti kaudu kahe lähestikku asuva 5'UTR HCVi RNA saidi vahel (Jopling, 2008). Selline positiivne regulatsioon 5'UTR kaudu erineb tavalisest miRNA funktsioonist, mis seisneb geeni ekspressiooni taseme alandamises 3'UTR kaudu.

Esimene etapp HCV replikatsioonis on viiruse polüpeptiidi translatsioon, mida soodustab IRES (*internal ribosome entry site*, sisemine ribosoomi sisenemiskoht), mis paikneb miR-122 sidumiskohtade taga. Järgmises etapis osalevad viirusvalgud viiruse RNA replikatsioonis. MiR-122 stimuleerib translatsiooni C-hepatiidi viiruse IRES-i kaudu, kuid see pole piisav, et täielikult selgitada miRNA mõju viiruse replikatsioonile (Lindenbach, 2005). Järgmised etapid replikatsiooni tsüklis tuleks samuti reguleerida, kuid on raske selgitada reaktsiooni mehhanisme. On teada, et toimub HCV RNA ja miR-122 vastastikune interaktsioon, mille tulemusena miRNA 3' ots kattub osaliselt viiruse 5' otsaga, mis viib potentsiaalse kaitse tekkimiseni 5→3 eksonukleasse aktiivsuse või viiruse RNA tsütoplasmaatiliste sensorite eest (Machlin, 2011).

Vilson ja tema kolleegid avastasid, et HCV regulatsioonis osaleb ka valk argonautide perekonnast (Wilson, 2011). Kuid Mahlini uuringud näitasid, et selle valgu saab asendada suurendatud miR-122 kogusega (Machlin, 2011). Seega täpset vastust küsimusele, kas miR-122 kasutab HCV regulatsiooni toimimises tavalist miRISC või nõuab täiendavaid komponente ja ebatavalisi valke, hetkel ei ole

Kuna olemasolevad HCV ravimid ei ole piisavalt efektiivsed või omavad toksilisi kõrvalmõjusid, on tekkinud huvi miR-122 võimaliku kasutamise suhtes HCV-vastases raviks. Jan Krützfeldt ja tema

kollegid pärssisid miR-122 ekspressiooni hiirtel, kasutades antagomiRi (Krützfeldt, 2005). Nad kartsid, et miRNA pärssimine muudab endogeensete sihtmärkide ekspressiooni, mis omakorda võib kaasa tuua kahjulikke tagajärgi. Kuid avastati, et katsel osalevatel loomadel ei ilmnunud toksilisi maksakahjustusi ning märgati ka kolesterooli olulist vähenemist. Teadlased kasutasid kiibi analüüsi, et kindlaks määrata need miRNAd, mille ekspressiooni tase on muutunud, kui miR-122 oli inhibeeritud. Nii tegid nad kindlaks, et mitmed valke kodeerivad mRNA-d, mis osalevad kolesterooli sünteesis, on miR-122 inhibeerimisel alla surutud. Seega võis oletada, et antud molekuli saab kasutada C-hepatiidi viiruse ning kõrge kolesteroolitasemega seotud häirete raviks.

Elmen jt kasutasid antagomiRide asemel LNA inhibitooreid, et vähendada miR-122 ekspressiooni taset (Elmen, 2008). Need manustati hiire maksa intravenoosse süstina. Selle tulemusena moodustus miR-122-inhibiitor heterodupleks, tõusis selliste mRNA tase, mis on miR-122 endogeensed sihtmärgid, samuti täheldati plasma kolesterooli langust. Lisaks sellele on näidatud, et vajalik annus on palju väiksem kui katsetes antagomiRidega.

Samal aastal testisid Elmen ja tema kolleegid LNA-l põhinevaid oligomeere rohepärdikul.

Tulemused olid väga sarnased sellele, mida nad said katsetes hiirtega. Ravikuur koosnes kolmest veenisisesest süstist ja kestis mitu nädalat. Plasma kolesterooli taseme vähenemine kestis 5-7 nädalat aga tõusis varasemale tasemele LNA ravi lõpetamisel. Saadud tulemused on lootustandvad ja näitavad, et miR-122 saab kasutada terapeutilistel eesmärkidel, kuna puudub toksilisus, samuti olid inhibiitori omadused püsivad ja pöörduvad, mis on väga oluline ravimi omadus.

2010. aastal viisid Landford jt läbi pilootuuringu nelja kroonilise C-hepatiidi viirusega nakatud šimpansi peal. Inhibiitor-molekulina kasutasid nad LNA-antimiR-122, praegu tuntud kui SPC3649. Ravikuur kestis 12 nädalat. Tulemused näitasid olulist viiruskoormuse vähenemist kahel uuritaval indiviidil, kes said suurema inhibiitori annuse (5mg/kg), ja ühel, kes sai madalama inhibiitori annuse (1mg/kg). Neljandal šimpansil täheldati viiruskoormuse suuri kõikumisi kogu katse jooksul, mis takistas hinnangu andmist ravimi toime või kahjulikkuse kohta. Selgus, et väike annus ravimit osutus oluliselt vähem efektiivseks.

Viiruskoormuse vähenemine jätkus terve ravikuuri vältel, samuti ei tuvastatud adaptiivsete mutatsioonide tekkemist miR-122'ga seonduvas HCV regioonis ning puudusid toksilised kõrvaltoimed. Kui miR-122 inhibiitorid osutuvad efektiivseks anti-HCV ravimiks, siis on võimalik seda kasutada osana kombineeritud ravist. Kuigi šimpansitel, kellele manustati SPC3649, vähenes viiruskoormus oluliselt, ei vabastanud ravi organismi viirusest täielikult. Samuti langesid tulemused inhibiitori kõrvaldamisel.

Praeguseks hetkeks on märgatav progress, mis on seotud C-hepatiidi viiruse proteaasete inhibiitorite kasutamisega. Kliinilistes katsetes kasutatakse kaht inhibiitorit – *telaprevir*-i ja *boceprevir*-i, mõlemad näitavad häid tulemusi viiruse mahasurumisel. Kuid nende ravimite suhtes võib tekkida resistentsus, mistõttu on vaja välja töötada uusi ravimeid. Lisaks sellele kasutatakse *telaprevir*-i ja *boceprevir*-i koos pegüleeritud intergeroon-a-ga ja ribaveriiniga, seega tekib toksilisuse oht ning paljudele patsientidele ei sobi see ravimeetod. Uute raviviiside arenemine, mis põhinevad väikeste molekulide kasutamisel, on soovitud eesmärk.

LNA-l ja SPC3649-l on kõik vajalikud omadused: mõjuvad efektiivselt, puudub toksilisus, testitud primaatide peal. See inhibiitor või teised sarnased molekulid on paremad kandidaadid anti-HCV teraapias osalemiseks.

Firma Santaris Pharma on läbi viinud selle molekuli, praegu tuntud kui *miraversen*, II faasi kliinilises katses. 2011. aasta lõpus ilmnesevad esimesed tulemused. Üheksal patsiendil kümnest ei leitud HCV RNA jälgi peale *miraversen*-i ravikuuri lõppu. Samuti reageerivad hästi ravile patsiendid kroonilise C-hepatiidiga. Ravi mõju on pikaajaline ning puuduvad teadaolevad koosmõjud teiste ravimitega.

Kokkuvõte

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli analüüsida miRNAde põhinevate terapeutiliste lahenduste erinevaid aspekte ning tuua välja nii perspektiivsemad edasised töösuunad kui ka olulised lahendamist vajavad kitsaskohad.

MiRNA-d avastati vaid kümme aastat tagasi ja juba praegu näeme terapeutilisi preparaate, mis põhinevad miRNAde kasutamisel. Need molekulid reguleerivad paljusid bioloogilisi protsesse ning nende ekspressiooni taseme muutus põhjustab mitmete haiguste teket. Sõltuvalt miRNA funktsioonist ja ekspressioonitaseme muutusest haigestunud rakkudes kasutatakse kas anti-miRNA oligonukleotiide, mis on vajalikud miRNA pärssimiseks, või miimikuid, mis taastavad endogeensete miRNAde ekspressiooni taseme. On välja töötatud erinevaid modifikatsioone, et tõsta sünteetiliste molekulide resistentsust nukleasidele suhtes, pärssida immuunvastust ning parandada koheletoimetamist sihtmärgini.

Käesolevaks ajaks on läbi viidud palju *in vitro* ja *in vivo* katseid, kasutades antimir-e või miimikuid. Samuti on jõutud esimeste katseteni reaalsetel patsientidel. Antagomir-miR-122 on esimene miRNA, mis jõudis kliiniliste uuringute II faasini, ning näitab efektiivset toimet hepatiit C-viiruse ravis. On olemas ka teisi miRNA-sid, mis jõuvad varsti kliiniliste katsete staadiumisse, näiteks miR-34 miimikud ning miR-208 ja miR-10b antagonistid.

Vaatamata sellele, et on olemas näited edukate katsete kohta, pole hetkel kasutusel olevad tehnoloogiad siiski ideaalsed ning miRNAde terapeutilistel eesmärkidel kasutamiseks tuleb lahendada veel mitmeid probleeme. Olulisemateks on sihtmärgini toimetamise vahendide arendamine, toksiliste toimete riski vähendamine ning õige doosi määramine. Tuleb meele pidada, et üks miRNA võib erinevates kudees omada nii positiivset kui ka patogeenset mõju. Kindlasti on vaja koguda rohkem andmeid miRNAde rolli kohta erinevate haiguste kujunemisel.

Using microRNAs for therapeutic purposes

Julia Gretšanaja

Summary

MicroRNAs are ~ 19 – 22 nucleotide long single - stranded non - coding RNA molecules, which regulate gene expression by degradation of complementary mRNA or by translational repression. MiRNAs control over 30% of protein coding genes. Additionally, single miRNA may control multiple genes. Since these molecules play an important role in a wide range of biological processes, this has generated interest in therapeutic use of miRNAs against variety of diseases.

The aim of this thesis was to analyze different aspects of miRNA based therapeutic tools, indicate promising directions for further research and identify limitations requiring further solutions.

There are two main strategies in using miRNA as a therapeutic tool. These include repression of miRNAs by miRNA antagonists and restoring expression of endogenous miRNAs by miRNA mimics. Various modifications of synthetic molecules that increase resistance to nuclease degradation, suppress the immune responses and improve delivery have been developed.

By now a large number of in vitro and in vivo experiments have been performed using miRNA antagonists and mimics. Clinical trials involving human subjects have been also initiated.

AntagomiR – 122 is the first miRNA, which was included in phase II clinical trial and showed positive result in treatment of hepatitis C virus. There are also other miRNAs, which may soon be included in clinical trials: testing of miR – 34 mimics should begin in 2013, miR - 208 and miR - 10b antagonists may soon be included as well.

Despite these results that show therapeutic potential of miRNAs, there are still several limitations which prevent using miRNA-based therapeutic tools. For example, the future directions of research should include development of more efficient delivery methods and reducing the risk of toxic side effects. Determination of proper dosage is also an issue that needs a solution. There is also a need to collect more data on miRNA and diseases. The final step will be the inclusion of miRNA-based drugs in clinical trials.

Kasutatud kirjandus

- Ajay, S. S., Athey, B. D., Lee, I. (2010). Unified translation repression mechanism for microRNAs and upstream AUGs. *BMC Genomics* 11:155.
- Akao, Y., Nakagawa, Y., Naoe, T. (2006). let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull.* 29(5):903–6.
- Ameres, S. L., Horwich, M. D., Hung, J. H., Xu, J., Ghildiyal, M., Wenig, Z. et al. (2010). Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science* 328:1534–1539.
- Arukuusk, P., Pärnaste, L., Oskolkov, N., Copolovici, D., M., Margus, H., Padari, K., Möll, K., Maslovskaja, J., Tegova, R., Kivi, G., Tover, A., Pooga, M., Ustav, M., Langel, U. (2013). New generation of efficient peptide-based vectors, NickFects, for the delivery of nucleic acids. *Biochim Biophys Acta.* 1828(5):1365-73.
- Bai, S., Nasser, M. W., Wang, B., Hsu, S. H., Datta, J., Kutay, H., et al. (2009). MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *J Biol Chem* 2009; 284:32015-27.
- Barbato, C., Ruberti, F., Cogoni, C. (2009). Searching for MIND: MicroRNAs in Neurodegenerative Disease. *J Biomed Biotechnol* 2009:871313.
- Berdnik, D., Fan, A.P., Potter, C.J., Luo, L. (2008). MicroRNA Processing Pathway Regulates Olfactory Neuron Morphogenesis. *Curr. Biol.* 18: 1754-1759.
- Berezikov, E., Thuemmler, F., van Laake, L. W., Kondova, I., Bontrop, R., Cuppen, E., Plasterk, R. H. (2006). Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. *Nat Genet.* 38:1375–1377.
- Bertram, L., Tanzi, R. (2005). The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 115: 1449-57.
- Bloomston, M., Frankel, W., L., Petrocca, F., Volinia, S., Alder, H., Hagan, J.P., Liu, C.G., Bhatt, D., Taccioli, C., Croce, C., M. (2007). MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis *JAMA*, 297(17):1901-1908
- Bommer, G. T., Gerin, I., Feng, Y., Kaczorowski, A. J., Kuick, R., Love, R. E., et al. (2007). p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol.* 17(15):1298–307.
- Borchert, G. M., Lanier, W., Davidson, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2006 Dec;13(12):1097-101.
- Calin, G.A., M. Ferracin, A. Cimmino, G. Di Leva, M. Shimizu, S.E. Wojcik, M.V. Iorio, R. Visone, N.I. Sever, M. Fabbri, R. Iuliano, T. Palumbo, F. Pichiorri, C. Roldo, R. Garzon, C. Sevignani, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C.-g. Liu, T.J. Kipps, M. Negrini, and C.M. Croce. (2005). A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine.* 353:1793-1801.
- Callis, T. E., Pandya, K., Seok, H. Y., Tang, R. H., Tatsuguchi, M., Huang, Z. P., Chen, J. F., Deng, Z., Gunn, B., Shumate, J., Willis, M. S., Selzman, C. H., Wang, D. Z. (2009). MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest.* 119(9):2772–2786.
- Chai, G., Liu, N., Ma, J., Li, H., Oblinger, J. L., Prahalad, A. K., et al. (2010). MicroRNA-10b regulates tumorigenesis in neurofibromatosis type 1. *Cancer Sci* 101:1997-2004.
- Chang, T. C., Mendell, J. T. (2007). microRNAs in vertebrae physiology and human disease. *Annu*

- Chekulaeva, M., Filipowicz, W. (2009). Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol* 21:452-60.
- Cheng, H. Y., Papp, J. W., Varlamova, O., Dziema, H., Russell, B., Curfman, J. P., Nakazawa, T., Shimizu, K., Okamura, H., Impey, S., Obrietan, K. (2007). microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron*. 2007 Jun 7;54(5):813-29.
- Chisari, F., V. (2005). Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. *Nature*; 436:930-2;
- Chiu, Y., L., Rana, T., M. (2003). siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. *RNA* 9: 1034–1048.
- Cogswell, J.P., Ward, J., Taylor, I.A., Waters, M., Shi, Y.L., Cannon, B., Kelnar, K., Kemppainen, D., Brown, C., Chen, R.K., Prinjha, J.C., Richardson, A.M., Saunders, A.D., Roses, J., Richards, C.A. (2008). Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J. Alzheimers Disease* 14: 27-41.
- Coulouarn, C., Factor, V. M., Andersen, J. B., Durkin, M. E., Thorgeirsson, S. S. (2009). Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene* 28:3526-36.
- Davis, S., Lollo, B., Freier, S., Esau, C. (2006). Improved targeting of miRNA with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 34:2294–2304.
- Doench, J. G., Sharp, P. A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.*;18(5):504-11.
- Eberle, F., Giessler, K., Deck, C., Heeg, K., Peter, M., Richert, C., et al. (2008). Modifications in small interfering RNA that separate immunostimulation from RNA interference. *J Immunol*. 180(5):3229–37.
- Esau, C., Davis, S., Murray, S. F., Yu, X. X., Pandey, S. K., Pear, M., et al. (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 3:87–98.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., Izaurralde, E. (2009) Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* 15: 21–32
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 9(2):102-14.
- Foley, N. H., Bray, I., Watters, K. M., Das, S., Bryan, K., Bernas, T., et al. (2011). MicroRNAs 10a and 10b are potent inducers of neuroblastoma cell differentiation through targeting of nuclear receptor corepressor 2. *Cell Death Differ* 18:1089-98.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;19:92-105.
- Fu, Y., Y. Zhang, Z. Wang, L. Wang, X. Wei et al., (2010). Regulation of NADPH oxidase activity is associated with miRNA-25-mediated NOX4 expression in experimental diabetic nephropathy. *Am. J. Nephrol.*, 32: 581-589.
- Gantier, M. P., Sadler, A. J., Williams, B. R. (2007). Fine-tuning of the innate immune response by microRNAs. *Immunol Cell Biol*. 85(6):458-62. Epub 2007 Jul 10.
- Garzon, R., Heaphy, C. E., Havelange, V., Fabbri, M., Volinia, S., Tsao, T., et al. (2009). MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood*. 114(26):5331–41.
- Godlewski, J., Nowicki, M., O., Bronisz, A., Williams, S., Otsuki, A., Nuovo, G., Raychaudhury, A., Newton, H., B., Chiocca, E., A., Lawler, S. (2008). Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res*. 68(22):9125-30.
- Grimson, A., Farh, K. K., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., Bartel, D. P. (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27:91-105.

- Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., Bartel, D. P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466:835-40.
- Hamm, S., Latz, E., Hangel, D., Muller, T., Yu, P., Golenbock, D., et al. (2010). Alternating 2'-O-ribose methylation is a universal approach for generating non-stimulatory siRNA by acting as TLR7 antagonist. *Immunobiology*. 215(7):559-69.
- Hassan, O., A. Ahmad, S. Sethi, F.H. Sarkar (2012). Recent updates on the role of microRNAs in prostate cancer. *J. Hematol. Oncol.*, 5: 9
- Heinzelmann, J., Henning, B., Sanjmyatav, J., Posorski, N., Steiner, T., Wunderlich, H., et al. (2011). Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *World J Urol* 29:367-73.
- Hermeking H. (2010). The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ*. 17(2):193-9.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Bálint, E., Tuschl, T., Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 3;293(5531):834-8.
- Huse, J.,T., Holland, E.,C. (2010). Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer*. 10(5):319-31
- Iorio, M. V., Ferracin, M., Liu, C. G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., et al. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 65(16):7065-70.
- Ji, Q., Hao, X., Meng, Y., Zhang, M., Desano, J., Fan, D., et al. (2008). Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres. *BMC Cancer*. 8:266.
- Ji, Q., Hao, X., Zhang, M., Tang, W., Yang, M., Li, L., et al. (2009). MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumorinitiating cells. *PLoS One*. 4(8):e6816.
- Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., et al. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120(5):635-47.
- Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M., Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 2;309(5740):1577-81.
- Khan, A.,A., Betel, D., Miller, M.,L., Sander, C., Leslie, C.,S., Marks, D.,S. (2009). Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat Biotechnol* 27: 549-555.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003; 115(2):209-16.
- Kitade, Y.; Akao, Y. (Oct 2010). "MicroRNAs and Their Therapeutic Potential for Human Diseases: MicroRNAs, miR-143 and -145, Function as Anti-oncomirs and the Application of Chemically Modified miR-143 as an Anti-cancer Drug." *J Pharmacol Sci* 114 (3): 276-280.
- Kojima, K., Fujita, Y., Nozawa, Y., Deguchi, T., Ito, M. (2010). MiR-34a attenuates paclitaxel-resistance of hormone-refractory prostate cancer PC3 cells through direct and indirect mechanisms. *Prostate*. 70(14):1501-12.
- Konopleva, M., R. Contractor, T. Tsao, I. Samudio, P.P. Ruvolo, S. Kitada, X. Deng, D. Zhai, Y.-X. Shi, T. Sneed, M. Verhaegen, M. Soengas, V.R. Ruvolo, T. McQueen, W.D. Schober, J.C.Watt, T. Jiffar, X. Ling, F.C. Marini, D. Harris, M. Dietrich, Z. Estrov, J. McCubrey, W.S. May, J.C. Reed, and M. Andreeff. (2006). Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 10:375-388.
- Korpal, M., Lee, E. S., Hu, G., Kang, Y. (2008). The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 283:14910-4.

- Kosaka, N.; Iguchi, H.; Ochiya, T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.* 2010, 101, 2087-2092.
- Kota, J., Chivukula, R., O'Donnell, K., Wentzel, E., Montgomery, C., Hwang, H., Chang, T., Vivekanandan, P., Torbenson, M., Clark, K., Mendell, J., Mendell, J., T. (2010). Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell*; 137(6):1005-17.
- Kruse, J.-P., ja W. Gu. (2009). Modes of p53 Regulation. *Cell*. 137:609-622.
- Kutay, H., Bai, S., Datta, J., Motiwala, T., Pogribny, I., Frankel, W., et al. (2006). Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem* 99:671-8.
- Lan, F. F., Wang, H., Chen, Y. C., Chan, C. Y., Ng, S. S., Li, K., et al. (2011). Hsa-let-7g inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by downregulation of c-Myc and upregulation of p16 (INK4A). *Int J Cancer*. 128(2):319–31.
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A. O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N. D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foa, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., Muller, R. U., Schermer, B., Bissels, U., Inman, J., Phan, Q., Chien, M., Weir, D. B., Choksi, R., De Vita, G., Frezzetti, D., Trompeter, H. I., Hornung, V., Teng, G., Hartmann, G., Palkovits, M., Di Lauro, R., Wernet, P., Macino, G., Rogler, C. E., Nagle, J. W., Ju, J., Papavasiliou, F. N., Benzing, T., Lichter, P., Tam, W., Brownstein, M. J., Bosio, A., Borkhardt, A., Russo, J. J., Sander, C., Zavolan, M., Tuschl, T. A. (2007). mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*. 129:1401–1414.
- Layzer, J., McCaffrey, A., Tanner, A., Huang, A., Kay, M., & Sullenger, B. (2004). In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA*, 10, 766-771.
- Lee, Y. S., Dutta, A. (2007). The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev*. 21(9):1025–30.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 425(6956):415-9.
- Lennox, K. A., Behlke, M. A. (2010). A direct comparison of anti-microRNA oligonucleotide potency. *Pharm Res* 27:1788–1799.
- Li, G., Wu, Z., Peng, Y., Liu, X., Lu, J., Wang, L., et al. (2010). MicroRNA-10b induced by Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein-1 promotes the metastasis of human nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Lett* 299:29-36.
- Li, Y., F. Wang, J. Xu, F. Ye, Y. Shen, J. Zhou, W. Lu, X. Wan, D. Ma, and X. Xie. (2011). Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV527 related target genes for miR-29. *The Journal of Pathology*. 224:484-495.
- Lindenbach, B.D., Rice, C.M. (2005). Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*; 436:933-8;
- Liu, C., Kelnar, K., Liu, B., Chen, X., Calhoun-Davis, T., Li, H., et al. (2011). The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med*. 17(2):211–5.
- Liu, Y., N.E. Taylor, L. Lu, K. Usa, A.W. Cowley, Jr., N.R. Ferreri, N.C. Yeo, and M. Liang. 2010. Renal medullary microRNAs in Dahl salt-sensitive rats: miR-29b regulates several collagens and related genes. *Hypertension*. 55:974-982.
- Long, X. B., Sun, G.B., Hu, S., Liang, G. T., Wang, N., Zhang, X. H., et al. (2009). Let-7a microRNA functions as a potential tumor suppressor in human laryngeal cancer. *Oncol Rep*. 22(5):1189–95.

- Ma, L., Reinhardt, F., Pan, E., Soutschek, J., Bhat, B., Marcusson, E. G., et al. (2010). Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat Biotechnol* 28:341-7.
- Maher, C. A., Kumar-Sinha, C., Cao, X., Kalyana-Sundaram, S., Han, B., Jing, X., Sam, L., Barrette, T., Palanisamy, N., Chinnaiyan, A. M. (2009). "Transcriptome Sequencing to Detect Gene Fusions in Cancer". *Nature* 458 (7234): 97–101.
- Machlin, E., S., Sarnow, P., Sagan, S., M. (2011). Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc Natl Acad Sci USA*; 108:3193-8;
- Malik, R., Roy, I. (2008). Design and development of antisense drugs. *Expert Opin Drug Dis.* 3:1189–207.
- Maurer, B., J. Stanczyk, A. Jungel, A. Akhmetshina, M. Trenkmann, M. Brock, O. Kowal-Bielecka, R.E. Gay, B.A. Michel, J.H. Distler, S. Gay, and O. Distler. (2010). MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 62:1733-1743.
- Meister, G., Landthaler, M., Dorsett, Y., Tuschl, T. (2004). Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA* (3):544-50.
- Miranda, K.C., Huynh, T., Tay, Y., Ang, Y.S., Tam, W.L., Thomson, A.M., Lim, B., Rigoutsos, I. (2006). A pattern-based method for the identification of MicroRNA bindingsites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 126:1203
- Montgomery, R. L., Hullinger T. H., Semus, H. M., Dickinson, B. A., Seto, A.G., Lynch, J. M., Stack, C., Latimer, P. A., Olson, E. N, van Rooij, E. (2010). Therapeutic Inhibition of miR-208a Improves Cardiac Function and Survival During Heart Failure. *Circulation.* 2011; 124: 1537-1547.
- Mott, J.L., S. Kobayashi, S.F. Bronk, and G.J. Gores. (2007). mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene.* 26:6133-6140.
- Nguyen, T., C. Kuo, M.B. Nicholl, M.S. Sim, R.R. Turner, D.L. Morton, and D.S. Hoon. (2011). Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma. *Epigenetics.* 6:388-394.
- Pandit, K.V., J. Milosevic, and N. Kaminski. (2011). MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Translational Research.* 157:191-199.
- Pekarsky, Y., U. Santanam, A. Cimmino, A. Palamarchuk, A. Efanov, V. Maximov, S. Volinia, H. Alder, C.-G. Liu, L. Rassenti, G.A. Calin, J.P. Hagan, T. Kipps, and C.M. Croce. (2006). Tcl1 Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia Is Regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Research.* 66:11590-11593.
- Petersen, M., J. Wengel, (2004). LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol* 21:74-81.
- Petrocca, F., Vecchione, A., Croce, C.M. (2008). Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res.* 68, 8198-8194.
- Place, R. F., Li, L. C., Pookot, D., Noonan, E. J., Dahiya, R. (2008). MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:1608-13.
- Piepoli, A., F. Tavano, M. Copetti, T. Mazza, O. Palumbo et al. (2012). Mirna expression profiles identify drivers in colorectal and pancreatic cancers *PLoS One*, 7: e33663-e33663.
- Poy, M. N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., Macdonald, P. E., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P., Stoffel, M. (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature.* 2004 Nov 11;432(7014):226-30.
- Prakash, T., P., Bhat, B. (2007). 2'-Modified oligonucleotides for antisense therapeutics. *Curr Top Med Chem.* 7:641–649.

- Qin, W., A.C. Chung, X.R. Huang, X.M. Meng, D.S. Hui, C.M. Yu, J.J. Sung, and H.Y. Lan. 2011. TGF- β /Smad3 Signaling Promotes Renal Fibrosis by Inhibiting miR-29. *J Am Soc Nephrol.* 22:1462-1474.
- Rayner, K. J., Sheedy, F. J., Esau, C. C., Hussain, F. N., Temel, R. E., Parathath, S., van Gils, J. M., Rayner, A. J., Chang, A. N., Suarez, Y., Fernandez-Hernando, C., Fisher, E. A., Moore, K. J. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J Clin Invest* doi:10.1172/JCI57275.
- Rayner, K. J., Esau, C. C., Hussain, F. N., McDaniel, A. L., Marshall, S. M., van Gils, J. M., Ray, T. D., Sheedy, F. J., Goedeke, L., Liu, X., Khatsenko, O. G., Kaimal, V., Lees, C. J., Fernandez-Hernando, C., Fisher, E. A., Temel, R. E., Moore, K. J. (2011). Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature.* 19;478(7369):404-7.
- Riley, T., E. Sontag, P. Chen, and A. Levine. 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:402-412.
- Roderburg, C., G.W. Urban, K. Bettermann, M. Vucur, H. Zimmermann, S. Schmidt, J. Janssen, C. Koppe, P. Knolle, M. Castoldi, F. Tacke, C. Trautwein, and T. Luedde. 2011. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology.* 3:209-218.
- Roggli, E., Guay, C., Nesca, V., Jacovetti, C. Regazzi, R. (2011). Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Transl Res.* 157(4):253-64.
- Sassen, S., Miska, E.A, Caldas, C. (2008). MicroRNA: implications for cancer. *Virchows Arch.* 452(1):1-10.
- Savas, J.N., Makusky, A., Ottosen, S., Baillat, D., Then, F., Krainc, D., Shiekhatar, R., Markey, S.P., Tanese, N. (2008). Huntington's disease protein contributes to RNA-mediated gene silencing through association with Argonaute and P bodies. *PNAS* 105: 10820-10825.
- Sampson, V. B., Rong, N. H., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., et al. (2007). MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.* 67(20):9762–70.
- Sekiya, Y., T. Ogawa, K. Yoshizato, K. Ikeda, and N. Kawada. 2011. Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 412:74-79.
- Schooneveld, E.V., M.C. Wouters, I.V.D. Auwera, D.J. Peeters, H. Wildiers et al., (2012). Expression profiling of cancerous and normal breast tissues identifies microRNAs that are differentially expressed in serum from patients with (metastatic) breast cancer and healthy volunteers. *Breast Cancer Res.*, 4: R34-R34.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.* 2003;115(2):199-208.
- Sioud, M., Furset, G., Cekaite, L. (2007). Suppression of immunostimulatory siRNA-driven innate immune activation by 2'-modified RNAs. *Biochem Biophys Res Commun.* 361(1):122–6.
- Srivastava, S.K., A. Bhardwaj, S. Singh, S. Arora, B. Wang jt. (2011). MicroRNA-150 directly targets MUC4 and suppresses growth and malignant behavior of pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis*, 12: 1832-1839.
- Sugahara, K.,N., Teesalu, T., Prakash, P.,K., Venkata Ramana Kotamraju, Agemy, L., Girard, O., Hanahan, D., Mattrey, F., R., Ruoslahti, E. (2009). Tissue-Penetrating Delivery of Compounds and Nanoparticles into Tumors. *Cancer Cell* 16, 510–520,
- Zenz, T., Mohr, J., Eldering, E., Kater, A. P., Bühler, A., Kienle, D., Winkler, D., Dürig, J., van Oers, M. H., Mertens, D., Döhner, H., Stilgenbauer, S. (2008). miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 113(16):3801-8.
- Zhao, J.-J., J. Lin, T. Lwin, H. Yang, J. Guo, W. Kong, S. Dessureault, L.C. Moscinski, D.

- Rezania, W.S. Dalton, E. Sotomayor, J. Tao, and J.Q. Cheng. 2010. microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood*. 115:2630-26.
- Tarasov, V., Jung, P., Verdoodt, B., Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., et al. (2007). Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle*. 6(13):1586–93.
- Tavazoie, S.F., Alarcon, C., Oskarsson, T., Padua, D., Wang, Q., Bos, P.D., Gerald, W.L., Massague, J. (2008). Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 451, 147-152.
- Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A.M., Lim, B. and Rigoutsos, I. (2008) MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 455, 1124-1128
- Tian, Y., Luo, A., Cai, Y., Su, Q., Ding, F., Chen, H., et al. (2010). MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 in human esophageal cancer cell lines. *J Biol Chem*. 12;285(11):7986-94.
- Trang, P., Wiggins, J. F., Daige, C. L., Cho, C., Omotola, M., Brown, D., et al. (2011). Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Mol Ther*.
- Van Rooij, E., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Hill, J., Olson, E. N. (2007). Control of stress dependent cardiac growth and gene expression by miRNA. *Science* 316: 575-9.
- Van Rooij, E., Quiat, D., Johnson, B. A., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Kelm, R. J. Jr, Olson E. N. (2009). A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell*.17: 662–673.
- Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell*.2009;136:586–591.
- Wakiyama, M., Yokoyama, S. (2010). MicroRNA-mediated mRNA deadenylation and repression of protein synthesis in a mammalian cell-free system. *Prog Mol Subcell Biol* 50:85-97.
- Wang, Q., S. Wang, H. Wang, P. Li, Z. Ma, (2012). MicroRNAs: Novel biomarkers for lung cancer diagnosis, prediction and treatment. *Exp. Biol. Med.*, 237: 227-235.
- Wiggins, J. F., Ruffino, L., Kelnar, K., Omotola, M., Patrawala, L., Brown, D., et al. (2010). Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Res*. 70(14):5923–30.
- Wilson, J.,A., Zhang, C., Huys, A., Richardson, C.,D. (2011). Human Ago2 is required for efficient microRNA 122 regulation of hepatitis C virus RNA accumulation and translation. *J Virol* 85:2342-50
- Xiong, Y., J.-H. Fang, J.-P. Yun, J. Yang, Y. Zhang, W.-H. Jia, and S.-M. Zhuang. 2010. Effects of MicroRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 51:836-845.
- Yanaihara, N., N. Caplen, E. Bowman, M. Seike, K. Kumamoto, M. Yi, R.M. Stephens, A. Okamoto, J. Yokota, T. Tanaka, G.A. Calin, C.-G. Liu, C.M. Croce, and C.C. Harris. 2006.Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 9:189-198.
- Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C. J. (2008). MiR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(36):13421–6.
- Yu, F., Yao, H., Zhu, P., Zhang, X., Pan, Q., Gong, C., et al. (2007). let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 131:1109-23.

Kasutatud veebiaadressid

1. www.mirbase.org
2. *202.38.126.151/hmdd/mirna/md*

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina

Julia Gretšanaja

(autori nimi)

(sünnikuupäev: **23.06.1990**)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
MikroRNAd kasutusvõimalused terapeutilistel eesmärkidel,
(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on

Tarmo Annilo,

(juhendaja nimi)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **kk.pp.aaaa** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2013 (*kuupäev*)